

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
14 juin 2001 (14.06.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 01/42491 A2**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>: C12Q 1/37, 1/04, C12R 1/385

(74) Mandataire: BONNEAU, Gérard: Cabinet Bonneau, Les Taissounières HB3, 1681, route des Dolines, F-06560 Sophia Antipolis (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/03398

(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Date de dépôt international:

6 décembre 2000 (06.12.2000)

(25) Langue de dépôt:

français

(26) Langue de publication:

français

(30) Données relatives à la priorité:

99/15312 6 décembre 1999 (06.12.1999) FR

(84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*): BIOMERIEUX S.A. [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy l'Etoile (FR).

Publiée:

— Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): DESMONCEAUX, Mireille [FR/FR]; 101, rue du Crapier, F-01150 Lagnicu (FR). MONGET, Daniel [FR/FR]; Résidence du Moulin, 13, rue du Moulin-du-Buis, F-01150 Saint-Sorlin-en-Bugey (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: NOVEL ENZYMATIC SUBSTRATES FOR DETECTING *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, COMPOSITIONS CONTAINING SAME AND METHOD FOR DETECTING SAID SPECIES

(54) Titre: NOUVEAUX SUBSTRATS ENZYMATIQUES POUR LA DETECTION DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, COMPOSITIONS LES CONTENANT ET PROCÉDE DE DETECTION DE CETTE ESPECE

(57) Abstract: The invention concerns an enzymatic substrate consisting of a target portion and a marker portion, the target portion being separated from the marker portion by hydrolysing the substrate, said target portion characterising the desired enzymatic activity. The invention also concerns a composition containing at least such a substrate and a method for detecting the *Pseudomonas aeruginosa* bacterial species. The target portion of the substrate enables to reveal a  $\beta$ -alanine aminopeptidase enzymatic activity and the marker portion is a molecule revealing the hydrolysis reaction. The invention is particularly useful in the field of diagnosis.

(57) Abrégé: La présente invention concerne un substrat enzymatique constitué d'une partie cible et d'une partie marqueur, l'hydrolyse du substrat permettant la séparation de la partie cible et de la partie marqueur, ladite partie cible caractérisant l'activité enzymatique recherchée. Elle concerne également une composition contenant au moins un tel substrat, ainsi qu'un procédé de détection de l'espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa*. La partie cible du substrat permet de révéler une activité enzymatique  $\beta$ -alanine aminopeptidase et la partie marqueur est une molécule révélant la réaction d'hydrolyse. L'invention trouve une application préférentielle dans le domaine du diagnostic.

WO 01/42491 A2

**Nouveaux substrats enzymatiques pour la détection de *Pseudomonas aeruginosa*,  
compositions les contenant et procédé de détection de cette espèce**

**DESCRIPTION**

5

La présente invention concerne un substrat utilisable dans un test de détection de l'activité enzymatique  $\beta$ -alanine aminopeptidase. Elle concerne également une composition contenant au moins un tel substrat, ainsi qu'un procédé de détection de l'espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa*.

10

*Depuis de très nombreuses années, on utilise des substrats particuliers pour permettre la détermination de la présence ou de l'absence d'activités enzymatiques caractéristiques de micro-organismes. Par le choix des substrats, selon qu'il y a réaction ou non, il est possible de caractériser la nature d'un genre de micro-organismes ou de différencier des souches et/ou des espèces d'un genre microbien donné.*

15

*Les substrats synthétiques d'enzymes sont constituées de deux parties, une première partie spécifique de l'activité enzymatique à révéler, ci-après appelée partie cible, et une seconde partie faisant office de marqueur, ci-après appelée partie marqueur.*

20

*Ces substrats particuliers peuvent être fluorescents ou chromogènes. En fait, c'est la seconde partie marqueur ou le produit de sa réaction avec un ou plusieurs autres composés, voir à ce propos la demande de brevet PCT/FR99/00781 déposée au nom de la demanderesse, qui est fluorescente ou chromogène lorsqu'elle n'est plus associée à la première partie cible.*

25

Or l'état de la technique ne décrit pas de test simple pour caractériser l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, qui reste pourtant une espèce des plus recherchées du fait de sa grande pathogénicité, sa fréquence de distribution assez importante et son implication dans de nombreuses maladies nosocomiales.

30

Conformément à la présente invention, on propose une gamme de substrats à base de  $\beta$ -Alanine comme partie cible, qui permettent tous une réelle détection de

*Pseudomonas aeruginosa*. L'invention concerne encore une composition contenant au moins un tel substrat ainsi qu'un procédé de détection de *Pseudomonas aeruginosa*.

Certes l'activité  $\beta$ -Alanine est déjà bien connue. Ainsi dans un article de Kasafirek, Evzen et al., intitulé « *Rôle of amino acid residues in chromogenic substrates cleaved by pancreatic elastase* », Collect. Czech. Chem. Commun. (1987), 52(6), 1625-33, il est mentionné des substrats chromogéniques comme par exemple la  $\beta$ -Alanine p-Nitroaniline (voir sa synthèse en page 1631).

La différence, qui nous semble essentielle par rapport à la présente invention, a pour objet la cible que nous visons à savoir *Pseudomonas aeruginosa*, et non l'enzyme d'Elastase pancréatique.

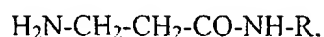
Un article provenant de J. B. Suszkiw, A. S. Brecher, sur « *Brain Aminoacyl Arylamidase. Further Purification of the Soluble Bovine Enzyme and Studies on Substrate Specificity and Possible Active-Site Residues* », Biochemistry, vol. 9, no. 20 (1970), pages 4008-4017, propose une technique de purification d'une Arylamidase soluble extraite de l'encéphale de bovins, la  $\beta$ -Alanine  $\beta$ -naphtylamine (voir sa synthèse en page 4010 2<sup>ème</sup> alinéa).

Là encore, la cible est complètement différente de celle que nous envisageons.

A cet effet, la présente invention concerne un substrat enzymatique constitué d'une partie cible et d'une partie marqueur, l'hydrolyse du substrat permettant la séparation de la partie cible et de la partie marqueur, ladite partie cible caractérisant l'activité enzymatique recherchée, caractérisé par le fait que la partie cible permet de révéler une activité enzymatique  $\beta$ -alanine aminopeptidase d'au moins un micro-organisme *Pseudomonas aeruginosa*, et la partie marqueur est une molécule révélant la réaction d'hydrolyse.

Selon une variante préférentielle de réalisation, la partie cible est constituée de  $\beta$ -Alanine ou d'un de ses dérivés et la partie marqueur est une molécule chromogène ou fluorescent.

Toujours selon une variante préférentielle de réalisation, le substrat est de formule :



où  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$  est la partie cible et  $-\text{NH}-\text{R}$  est la partie marqueur chromogène ou fluorescent du substrat.

Encore selon une variante préférentielle de réalisation, la partie marqueur est constituée de :

- 5 -  $\beta$ -Naphtylamine,
- Aminométhylcoumarine, tel que 7-amino-4-méthyl-coumarine,
- dérivé de l'Aminobenzène, tel que 4-amino-2,6-dichlorophénol,
- p-Nitroaniline, ou
- 2-amino-indoxyl ou 3-amino-indoxyl.

10 L'invention concerne également une composition permettant la détection d'au moins une souche et/ou une espèce de micro-organismes qui comprend au moins un substrat, tel que décrit ci-dessus, et un milieu de culture.

Selon une variante, la composition permettant la détection d'au moins souche et une espèce de micro-organismes ou d'au moins deux souches ou deux espèces de  
15 micro-organismes, qui comprend au moins un substrat, tel que décrit ci-dessus, au moins un autre substrat et un milieu de culture.

Selon une variante, le milieu de culture contient un révélateur.

Dans ce cas, le milieu de culture contient comme révélateur :

- du sel de diazonium, lorsque la partie marqueur libérée est la  $\beta$ -Naphtylamine, ou
- 20 - de l'Acide 3,5-dihydroxy-2-naphtoïque, lorsque la partie marqueur libérée est un dérivé de l'Aminobenzène.

Préférentiellement, la composition est sous la forme d'un milieu liquide ou d'un milieu gélosé.

L'invention concerne enfin un procédé de détection de l'espèce bactérienne  
25 *Pseudomonas aeruginosa*, ce procédé consiste :

- à mettre au moins un substrat permettant de détecter l'activité enzymatique  $\beta$ -alanine aminopeptidase en présence d'un échantillon suspecté de contenir au moins un micro-organisme *Pseudomonas aeruginosa*, et
- à observer l'apparition de réactions colorées et/ou fluorescentes.

30 Selon une variante, le procédé de détection de l'espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa*, consiste :

- à mettre au moins un substrat permettant de détecter l'activité enzymatique  $\beta$ -alanine aminopeptidase en présence d'un échantillon suspecté de contenir au moins un micro-organisme *Pseudomonas aeruginosa*,
- à mettre au moins un substrat permettant de détecter une activité enzymatique  
5 différente de  $\beta$ -alanine aminopeptidase en présence de l'échantillon suspecté de contenir au moins un autre micro-organisme que *Pseudomonas aeruginosa*, cette autre activité enzymatique permettant de différencier *Pseudomonas aeruginosa* de cet autre micro-organisme, et
- à observer l'apparition de réactions colorées et/ou fluorescentes.

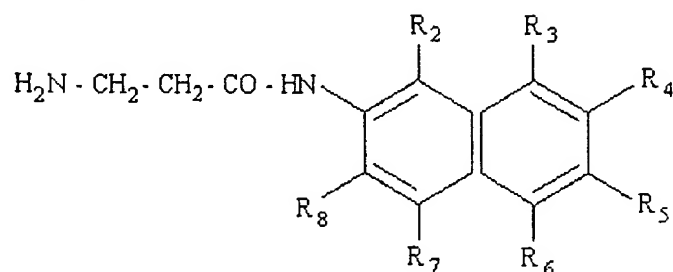
10 Dans les deux cas de figure ci-dessus, le milieu de culture est gélifié.

Dans ce cas, on ajoute dans ce milieu de culture un produit réduisant la migration de la ou des colorations obtenues.

15 La présente invention concerne l'utilisation d'une propriété biologique propre à la plupart des souches de l'espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa*, qui possède une activité  $\beta$ -alanine aminopeptidase. Cette propriété ne se retrouve que chez de rares autres espèces.

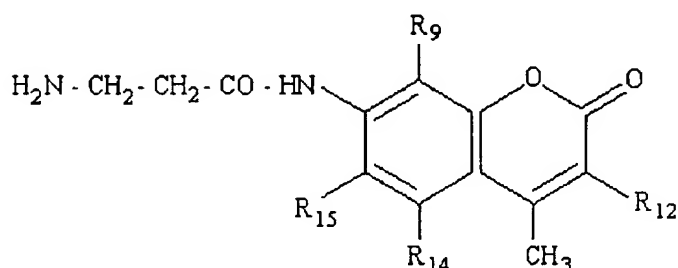
L'invention consiste à associer à la partie cible spécifique de l'enzyme, qui est constituée par la  $\beta$ -Alanine, une partie marqueur adaptée. De telles parties marqueurs  
20 pour révéler cette activité existent déjà, mais leur utilisation pour détecter *Pseudomonas aeruginosa* n'est pas connue, puisque le lien entre cette espèce et cette activité enzymatique n'a jamais été décrite.

Ainsi, la première famille de substrats est constituée d'une molécule ayant les Naphtylamines comme partie marqueur, dont l'une des formules, correspondant au  
25 substrat  $\beta$ -alanyl- $\beta$ -naphtylamide, est :



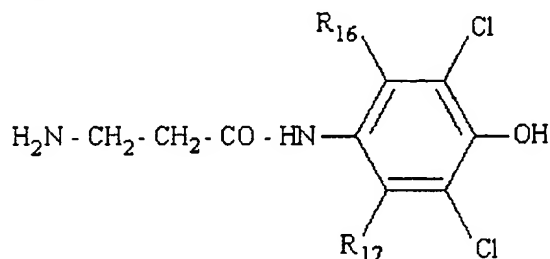
dans laquelle  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ , et  $R_8$  représentent un atome d'hydrogène ou de brome ou de chlore ou d'iode ou par un groupement de type  $-OH$ ,  $-CH_3$ ,  $-CH_2CH_3$ ,  $-OCH_3$ ,  $-OCH_2CH_3$  ou  $COOH$  à chacune de ces positions. La  $\beta$ -Naphthylamine peut être utilisée pour détecter l'activité  $\beta$ -alanine aminopeptidase, c'est ce que décrit la thèse de Docteur-Ingénieur de monsieur Daniel Monget, soutenue devant l'Université Claude Bernard - Lyon I le 4 juillet 1978 (N° d'ordre 297). Ce type de molécules étant incolore, il convient pour qu'elles soient utilisables d'ajouter un révélateur, tel que du sel de diazonium.

La deuxième famille de substrats de l'état de la technique est constituée par des molécules dont la partie marqueur est à base d'Aminométhylcoumarine, qui est fluorescente une fois libérée de sa partie cible. La formule générale de cette famille de substrats peut être déduite de la formule particulière suivante, qui correspond à la  $\beta$ -Alanyl-7-amido-4-méthylcoumarine :



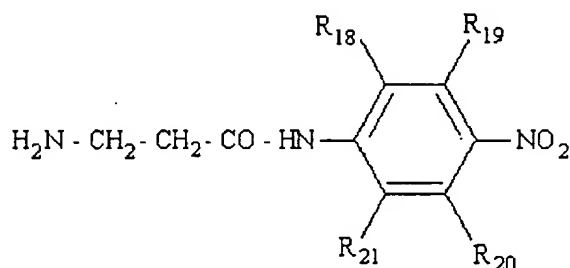
dans laquelle  $R_9$ ,  $R_{12}$ ,  $R_{13}$ ,  $R_{14}$  et  $R_{15}$  représentent un atome d'hydrogène ou de brome ou de chlore ou d'iode ou par un groupement de type  $-OH$ ,  $-CH_3$ ,  $-CH_2CH_3$ ,  $-OCH_3$ ,  $-OCH_2CH_3$  ou  $COOH$  à chacune de ces positions. Ce type de substrats est peu adapté à une utilisation dans des milieux gélifiés, et est plus utilisé en milieu liquide.

La troisième famille de substrats est constituée de  $\beta$ -Alanyl-4-amino-2,6-dichlorophénol ayant le 2,6-Dichloroaminophénol comme partie marqueur, dont la formule globale est la suivante :



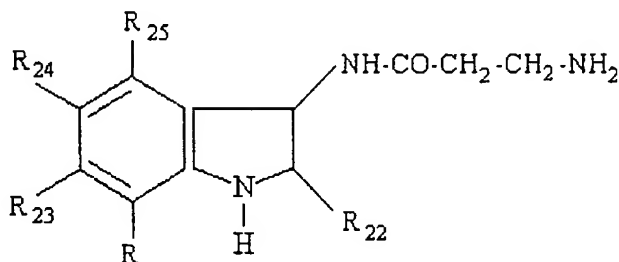
dans laquelle  $R_{16}$  et  $R_{17}$  représentent un atome d'hydrogène ou de brome ou de chlore ou d'iode ou par un groupement de type -OH, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> ou COOH à chacune de ces positions. Ce type de molécules a déjà été décrite dans une précédente demande de brevet WO-A-99/51767, déposée par la demanderesse, et nécessite la présence d'un révélateur séché, par exemple l'Acide 3,5 dihydroxy-2-naphtoïque. Toutefois, cette demande de brevet WO-A-99/51767 montre qu'il est possible d'utiliser d'autres molécules où les deux atomes de chlore et le groupement hydroxyle sont remplacés par un atome d'hydrogène ou de brome ou de chlore ou d'iode ou par un groupement de type -OH, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> ou COOH à chacune de ces positions.

La quatrième famille de substrats est à base de  $\beta$ -Alanyl p-nitroanilide ou dérivés, avec la p-Nitroaniline comme partie marqueur. La formule générale de ce type de substrats est la suivante :

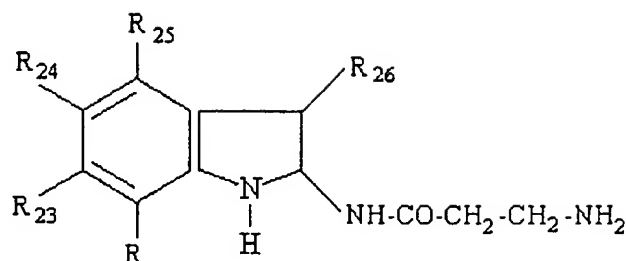


dans laquelle  $R_{18}$ ,  $R_{19}$ ,  $R_{20}$  et  $R_{21}$  représentent un atome d'hydrogène ou de brome ou de chlore ou d'iode ou par un groupement de type -OH, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> ou COOH à chacune de ces positions. Ce produit ne nécessite pas la présence d'un révélateur.

La cinquième famille de substrats est à base de 2-Amino-indole ou de 3-Amino-indole comme partie marqueur. La formule générale de ces substrats est la suivante pour le 2-Amino-indole:



et pour le 3-Amino-indole :



Tous ces substrats sont chromogènes à l'exception de la deuxième famille qui est fluorescente, et constituent tous des molécules permettant l'identification de l'activité enzymatique  $\beta$ -alanine aminopeptidase de *Pseudomonas aeruginosa*. Cette identification permet de bien différencier cette espèce pathogène en clinique d'autres espèces de bacilles à Gram négatif proches.

#### 1°) Substrats utilisés :

Les substrats enzymatiques utilisés sont de formule :



où  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$  est la  $\beta$ -Alanine, c'est-à-dire la partie cible du substrat et  $-\text{NH}_2-\text{R}$  est le chromogène, c'est-à-dire la partie marqueur dudit substrat.

Quatre substrats ont été testés qui correspondent aux quatre premières familles de substrats précédemment décrites. Il y a :

- la  $\beta$ -Alanyl- $\beta$ -naphtylamide, qui est commercialisée sous la référence K1035 par la société Bachem, Bubendorf, Suisse,
- la  $\beta$ -Alanyl-7-amido-4-méthylcoumarine, qui est commercialisée sous la référence I1030 par la société Bachem, Bubendorf, Suisse,
- la  $\beta$ -Alanyl-4-amino-2,6-dichlorophénol, dont la synthèse sera exposée ci-dessous, et
- la  $\beta$ -Alanine p-nitroanilide dont la synthèse sera exposée plus loin.

La synthèse de la  $\beta$ -Alanyl-4-amino-2,6-dichlorophénol est effectuée à partir de N-Tert-butoxycarboxyl- $\beta$ -alanine (1,89 g, 10 mmol). Ce N-Tert-butoxycarboxyl- $\beta$ -alanine est dissous dans du Tétrahydrofurane anhydre (HPLC grade, 30 ml). La solution est refroidie à 0°C en utilisant un bain de glace et de sel, et on ajoute du N-méthylmorpholine (2,02 g, 20 mmol). On porte la température en-dessous de -10°C, et



on ajoute l'Isobutyl chloroformate (2,74g, 20 mmol) graduellement tout en conserver la température en-dessous de -8°C. On ajoute à la suspension anhydre ci-dessus, une solution froide de 4-Amino-2,6-dichlorophénol (1,78 g, 10mmol), dissous dans du Diméthylformamide et traitée avec du N-méthylmorpholine (4,08 g, 40 mmol) pour  
5 libérer la base libre. Cette solution est maintenue en-dessous de la température ambiante avant l'addition ci-dessus mentionnée. Le mélange réactionnel obtenu est agité dans un bain de glace et de sel pendant 1 heure, et ensuite pendant 5 heures à la température ambiante. Une chromatographie couche mince indique une conversion presque complète de produit en amide. La suspension est filtrée pour éliminer  
10 l'Hydrochlorure de N-méthylmorpholine, le résidu étant lavé en ajoutant du Tétrahydrofurane. Ensuite on utilise un vaporisateur rotatif pour retirer le Tétrahydrofurane et un peu de Diméthylformamide, et puis on verse lentement la solution obtenue dans de l'eau glacée vigoureusement agitée. Le précipité gris est repris, bien lavé à l'eau et séché dans un four à vide à 30-40°C. Le produit est  
15 recristallisé dans le méthanol avec l'addition d'un peu d'eau, ce qui donne 1,72 g de petits cristaux blancs. Il s'agit du N- $\alpha$ -t-BOC- $\beta$ -alanyl-4-amino-2,6-dichlorophénol qui est ensuite dissous dans un minimum d'Acétate d'éthyle saturé de chlorure d'hydrogène. Après 2 heures à environ 16°C, la solution visqueuse est versée doucement dans 250 ml d'Ether diéthylique anhydre. Après 4 heures, le solide pulvérulent est récupéré par filtration sous vide et lavé à l'Ether diéthylique. Le produit  
20 est enfin séché dans un dessiccateur à vide et isolé pour minimiser l'hygroscopicité.

La synthèse de la  $\beta$ -Alanine p-nitroanilide est la suivante. Une masse de 2,76 grammes (g), soit 20 millimoles (mmol) de 4-Nitroaniline est dissoute par agitation en présence de 40 millilitres (ml) de pyridine séchée et préalablement refroidie à une  
25 température de moins 12°C. D'autre part, du Trichlorure de phosphore (1 ml redistillé) est ajouté à 12 ml de pyridine, toujours à la température de moins 12°C. Les deux solutions sont ensuite refroidies à moins 16°C et la deuxième solution contenant le Trichlorure de phosphore est ajoutée sous agitation à la première solution contenant la Nitroaniline. Ce mélange s'effectue entre moins 14 et moins 16°C pendant au moins 30  
30 minutes (mn) puis à température ambiante pendant la même durée. On ajoute ensuite par petites quantités successives 20 mmol, soit 4,46 g, du Benzyloxycarbonyl- $\beta$ -Alanine

sec à la solution ci-dessus agitée pendant au moins 5 mn. Cette agitation se poursuit pendant 14 heures (h) entre 30 et 40°C. La température est ensuite portée à 50°C et l'agitation est poursuivie encore pendant 8 h. Une chromatographie en couche mince d'un échantillon dilué montre qu'une grande partie des produits de base a été transformée en dérivé  $\beta$ -aminoacyl. On retire ensuite la pyridine par évaporation rotative à 50°C. L'huile visqueuse résiduelle est agitée vigoureusement avec de la glace pilée en présence d'éthanol. On obtient ainsi en partie un solide jaunâtre sur les parois du récipient le contenant et en partie une masse cristalline. Le solide est repris, filtré par aspiration et lavé avec de l'eau. Le produit séché à l'air est recristallisé dans l'éthanol chaud. Le produit sec pèse 4,3 g et est homogène par chromatographie en couche mince (CCM) utilisant des plaques de gel de silice (solvant - éthyl acétate/toluène). Le rendement est de 62,7%. La protection constituée par le Benzyloxycarbonyl, présent dans la Benzyloxycarbonyl- $\beta$ -alanine-p-nitroanilide, est ensuite éliminée. Ainsi, 2,15 g de cette substance sont dissous dans un volume minimal d'acide acétique glacial chaud sous agitation. A ce mélange, refroidi à 25°C est ajouté un volume égal de Bromure d'hydrogène à 30 % dans de l'acide acétique glacial sous agitation. Après 1 h 30 mn, la solution visqueuse est versée lentement dans 400 ml d'Ether diéthyl anhydre, sous agitation forte. La suspension blanche obtenue est ensuite filtrée et le résidu est lavé plusieurs fois par de l'éther anhydre, puis séché dans un dessiccateur à vide toute une nuit. On obtient ainsi 1,50 g de  $\beta$ -Alanine-p-nitroanilide, sous forme de sel de bromure.

2°) MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE  $\beta$ -ALANINE  
AMINOPEPTIDASE AU MOYEN DE DIFFERENTS SUBSTRATS  
ENZYMATIQUES :

25

A - Test du substrat  $\beta$ -Alanyl- $\beta$ -naphtylamide et de la sélectivité de la partie  
cible :

Plusieurs espèces, à raison de cinq souches par espèce, sauf si le nombre est précisé, ont été testées en présence de  $\beta$ -alanyl- $\beta$ -naphtylamide dans des galeries de type API ZYM de chez bioMérieux La Balme, France. Les réactions ont été effectuées avec des suspensions bactériennes à une densité de 4 Mc Farland (McF) dans du

30

tampon phosphate à 0,01M à pH 7,5. L'échelle de Mc Farland est une échelle de concentration bactérienne, où 4 McF correspondent à  $12.10^8$  bactéries par millilitre. Pour chaque souche, 80 microlitres de suspension sont introduits dans chacune des cupules de la galerie. Les galeries sont mises à incuber à 37°C pendant 4 h. La présence  
5  $\beta$ -alanine aminopeptidase est mise en évidence en ajoutant une goutte de ZYMB (sel de diazonium, Fast Blue BB), commercialisé par bioMérieux sous la référence 70480. L'apparition d'une coloration orange témoigne d'une réaction positive. Les résultats sont les suivants. Il y a une réaction négative pour les espèces énumérées ci-après, en d'autres termes aucune activité  $\beta$ -alanine aminopeptidase n'a été détectée :

- 10 - *Escherichia coli*,
- *Shigella* spp. (4 souches),
- *Shigella sonnei*,
- *Edwarsiella tarda* (2 souches),
- *Salmonella choleraesuis*,
- 15 - *Salmonella typhi*,
- *Salmonella* spp.,
- *Salmonella paratyphi A*,
- *Salmonella gallinarum* (3 souches),
- *Salmonella arizonae*,
- 20 - *Citrobacter freundii*,
- *Citrobacter diversus*,
- *Klebsiella pneumoniae*, spp. *pneumoniae*,
- *Klebsiella pneumoniae*, spp. *oxytoca*,
- *Klebsiella ozaenae*,
- 25 - *Klebsiella rhinoscleromatis* (3 souches),
- *Hafnia alvei*,
- *Enterobacter aerogenes*,
- *Enterobacter cloacae*,
- *Enterobacter sakazakii*,
- 30 - *Enterobacter gergoviae*,
- *Serratia marcescens*,

- *Serratia odorifera*,
- *Serratia fonticola*,
- *Serratia plymuthica*,
- *Proteus vulgaris*,
- 5 - *Proteus mirabilis*,
- *Proteus morganii*,
- *Proteus rettgeri*,
- *Providencia alcalifaciens*,
- *Providencia stuartii*,
- 10 - *Yersinia enterocolitica*,
- *Yersinia pseudotuberculosis*,
- *Pseudomonas putida*,
- *Comamonas acidovorans*,
- *Comamonas testosteroni*,
- 15 - *Pseudomonas alcaligenes*,
- *Pseudomonas stutzeri*,
- *Shewanella putrefaciens*,
- *Stenotrophomonas maltophilia*,
- *Brevundimonas diminuta*,
- 20 - *Brevundimonas vesicularis*,
- *Ralstonia picketti*,
- *Pseudomonas luteola*,
- *Pseudomonas oryzae*,  
- *Pseudomonas oryzae*,  
- *Sphingomonas paucimobilis*,
- 25 - *Sphingobacterium multivorum*,
- *Alcaligenes faecalis/odorans*,
- *Achromobacter xylosoxidans* spp. *denitrificans*,
- *Achromobacter xylosoxidans*, spp. *xylosoxidans*,
- *Bordetella bronchiseptica*,
- 30 - *Oligella ureolytica* (2 souches),
- CDC IV C<sub>2</sub>,

- *Aeromonas hydrophila*,
- *Plesiomonas shigelloïdes*,
- *Vibrio alginolyticus*,
- *Vibrio parahaemolyticus* (4 souches),
- 5 - *Chryseobacterium meningosepticum*,
- *Empedobacter brevis* (3 souches),
- *Chryseobacterium balustinum* (1 souche),
- *Chryseobacterium indologenes*,
- *Weeksella virosa* (4 souches),
- 10 - *Myroides* spp.,
- *Pasteurella gallinarum* (1 souche),
- *Pasteurella multocida*,
- *Pasteurella pneumotropica* (4 souches),
- *Actinobacillus ureae* (1 souche),
- 15 - *Pasteurella haemolytica*,
- *Pasteurella aerogenes*,
- proches de *Pasteurella* (4 souches),
- *Psychrobacter phenylpyruvicus* (4 souches),
- *Moraxella paraphenylpyruvica* (3 souches),
- 20 - *Moraxella lacunata* (4 souches),
- *Moraxella lac. sp. liquefaciens* (7 souches),
- *Moraxella non liquefaciens* (13 souches),
- *Moraxella bovis* (4 souches),
- *Moraxella osloensis* (18 souches), et
- 25 - *Actinobacillus* spp.

Par contre, il y a une réaction positive pour les quelques espèces énumérées ci-après, en d'autres termes une activité  $\beta$ -alanine aminopeptidase a été détectée :

- *Serratia liquefaciens*,
- *Pseudomonas aeruginosa*,
- 30 - *Pseudomonas fluorescens*,
- *Burkholderia cepacia*,

- *Pseudomonas mendocina*., et
- *Ochrobactrum anthropi*.

CDC veut dire Center for Disease Control. Les groupes CDC sont des désignations de groupes de souches en attente d'un nom d'espèce.

5        Le substrat  $\beta$ -alanyl- $\beta$ -naphtylamide et plus particulièrement la partie cible, la  $\beta$ -alanine, est donc particulièrement sélective puisque six (6) espèces seulement possèdent l'activité  $\beta$ -alanine aminopeptidase, pour soixante-dix-neuf (79) espèces qui ne la possèdent pas, soit environ 7,1% d'espèces positives parmi celles testées.

10        La différenciation de *Pseudomonas aeruginosa* parmi les six espèces peut facilement être réalisée en milieu gélosé par la présence d'une coloration verte due à la production de pyoverdine par cette espèce.

B - Test du substrat  $\beta$ -Alanyl-7-amido-4-méthylcoumarine et efficacité sur la détection de souches de *Pseudomonas aeruginosa* :

15        Le substrat  $\beta$ -Alanyl-7-amido-4-méthylcoumarine a été utilisé avec la méthodologie suivante. Les souches ont été isolées sur les milieux bioMérieux, France, suivants :

- Columbia sang de mouton,
- Trypticase soja sang de mouton, et
- 20 - Mac Conkey (milieu d'isolement des entérobactéries).

Les réactions ont été effectuées dans des cartes Vitek 2 (Marque déposée, bioMérieux, Saint Louis, Missouri, Etats-Unis d'Amérique) avec des suspensions bactériennes ajustées à une densité comprise entre 0,375 et 0,750 McF.

25        Le tableau 1 ci-dessous met en évidence l'intérêt ou non du substrat testé pour certaines espèces déjà abordées au chapitre précédent, ou pour de nouvelles espèces (par exemple *Ochrobactrum anthropi*).

Des tests simples comme l'hydrolyse de l'arginine (ADH) ou l'utilisation de l'acétamide permettent de séparer *Pseudomonas aeruginosa* de l'espèce *Ochrobactrum anthropi*.

ESPECES	Nombre de souches testées	Nombre de réactions négatives	Nombre de réactions positives	Réactions difficiles à interpréter
<i>Shigella boydii</i>	10	10	0	0
<i>Shigella dysenteriae</i>	10	10	0	0
<i>Shigella flexneri</i>	10	10	0	0
<i>Chromobacterium violaceum</i>	11	9	1	1
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	10	10	0	0
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	11	0	11	0
<i>Oligella urethralis</i>	10	10	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	137	2	134	1
<i>Ralstonia pickettii</i>	10	8	2	0
<i>Pseudomonas mendocina</i>	10	0	10	0
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	10	10	0	0
<i>Comamonas testoteroni</i>	10	10	0	0

Tableau 1 : Efficacité du substrat  $\beta$ -Alanyl-7-amido-4-méthylcoumarine

Le substrat est  $\beta$ -Alanyl-7-amido-4-méthylcoumarine est donc particulièrement efficace pour détecter les espèces :

- *Ochrobactrum anthropi*, puisque le taux de réactions positives est de 100%,
- *Pseudomonas aeruginosa*, puisque le taux de réactions positives est de 97,8%,
- et
- *Pseudomonas mendocina*, puisque le taux de réactions positives est de 100%.

La valeur trouvée pour *Pseudomonas aeruginosa* est particulièrement intéressante, car l'échantillonnage testé comprend 137 espèces. Les trois souches, qui ne réagissent pas ou qui réagissent mal, sont liées à la variabilité biologique de cette espèce.

D'autres espèces montrent une aptitude partielle à hydrolyser la  $\beta$ -alanyl-7-amido-4- méthylcoumarine, il s'agit de :

- *Ralstonia pickettii*, puisque le taux de réactions positives est de 20%, et
- *Chromobacterium violaceum*, puisque le taux de réactions positives est de 10%.

5

C - Test du substrat  $\beta$ -Alanyl-4-amino-2,6-dichlorophénol et efficacité sur la détection de souches de *Pseudomonas aeruginosa* :

Après isolement sur gélose Columbia au sang de mouton, les souches sont testées en milieux liquide sur des cartes Vitek 2 (Marque déposée, bioMérieux, Saint Louis, Missouri, Etats-Unis d'Amérique), contenant le substrat  $\beta$ -Alanyl-4-amino-2,6-dichlorophénol, en présence de l'Acide 3,5-dihydroxy-2-naphtoïque et un milieu réactionnel peptoné et tamponné à pH 8,5. Les densités des suspensions bactériennes sont de 0,5MF / NaCl 4,5 g/l. La lecture visuelle s'effectue après 22 à 24 heures d'incubation. Le tableau 2 ci-après expose les résultats qui ont été trouvés.

10

ESPECES	Nombre de souches testées	Nombre de réactions négatives	Nombre de réactions positives
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2	2	0
<i>Citrobacter freundii</i>	2	2	0
<i>Citrobacter koseri</i>	1	1	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	2	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	2	0
<i>Enterobacter intermedius</i>	1	1	0
<i>Escherichia coli</i>	2	2	0
<i>Proteus mirabilis</i>	2	2	0
<i>Proteus vulgaris</i>	1	1	0
<i>Providencia stuartii</i>	1	1	0
<i>Salmonella arizonae</i>	1	1	0
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	0	1



<i>Serratia marcescens</i>	3	0	3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	2	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	3	0
<i>Achromobacter xylosoxydans</i>	2	2	0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	2	0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	2	0
<i>Brevundimonas diminuta</i>	2	2	0
<i>Burkholderia vesicularis</i>	1	1	0
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	2	2	0
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	1	0	1
<i>Moraxella non liquefaciens</i>	2	2	0
<i>Myroides spp.</i>	1	1	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13	0	13
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2	1	1
<i>Pseudomonas mendocina</i>	1	0	1
<i>Pseudomonas putida</i>	1	1	0
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	3	3	0
<i>Ralstonia pickettii</i>	1	1	0
<i>Shewanella algae</i>	1	1	0
<i>Shewanella putrefaciens</i>	1	1	0
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2	2	0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	2	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	1	0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	2	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	2	0
<i>Enterococcus faecium</i>	2	2	0
<i>Vibrio vulnificus</i>	1	1	0

Tableau 2 : Efficacité du substrat  $\beta$ -Alanine-4-amino-2,6-dichlorophénol

Avec ce substrat,  $\beta$ -Alanyl-4-amino-2,6-dichlorophénol, on obtient des résultats qui sont toujours très significatifs avec *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens* et relativement significatif avec *Pseudomonas mendocina* et *Ochrobactrum anthropi*. Il peut donc y avoir un intérêt à combiner ce substrat avec un autre substrat permettant de distinguer *Pseudomonas aeruginosa* des autres micro-organismes qui ont une réactivité positive (voir 3<sup>ème</sup> paragraphe). Le cas de *Pseudomonas fluorescens* est difficile à interpréter et relève plutôt d'un problème de manipulation ou de la variabilité génétique de cette espèce.

De plus, on peut noter que la présence de polyvinyl pyruvate (PVP) améliore la coloration des réactions positives.

#### D - Test du substrat $\beta$ -Alanyl para-nitroanilide :

Il s'agit sensiblement de la même méthodologie que dans le paragraphe C précédent, à l'exception de la lecture visuelle qui s'effectue après 19h d'incubation. On a utilisé comme substrat la  $\beta$ -Alanyl p-nitroanilide. Le tableau 3 ci-après récapitule les résultats.

ESPECES	Nombre de souches testées	Nombre de réactions négatives	Nombre de réactions positives
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2	2	0
<i>Citrobacter freundii</i>	2	2	0
<i>Citrobacter koseri</i>	1	1	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	2	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	2	0
<i>Enterobacter intermedius</i>	1	1	0
<i>Escherichia coli</i>	2	2	0
<i>Proteus mirabilis</i>	2	2	0
<i>Proteus vulgaris</i>	1	1	0
<i>Providencia stuartii</i>	1	1	0

<i>Salmonella arizonae</i>	1	1	0
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	0	1
<i>Serratia marcescens</i>	1	0	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	2	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	2	0
<i>Achromobacter xylosoxydans</i>	2	2	0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	2	0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	2	0
<i>Brevundimonas diminuta</i>	1	1	0
<i>Burkholderia vesicularis</i>	1	1	0
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	1	1	0
<i>Moraxella non liquefaciens</i>	2	2	0
<i>Myroides</i> spp.	1	1	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	0	4
<i>Pseudomonas putida</i>	1	1	0
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	3	3	0
<i>Ralstonia pickettii</i>	1	1	0
<i>Shewanella algae</i>	1	1	0
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2	2	0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	2	0
<i>Vibrio vulnificus</i>	1	1	0

Tableau 3 : Efficacité du substrat  $\beta$ -Alanyl p-nitroanilide

Le résultat est donc très démonstratif puisque l'on distingue aisément la  
5 présence de *Pseudomonas aeruginosa* par rapport à d'autres espèces n'ayant pas  
l'activité enzymatique  $\beta$ -alanine aminopeptidase.

Les substrats ayant comme partie cible de la  $\beta$ -Alanine permettant de mettre en évidence l'activité  $\beta$ -alanine aminopeptidase sont donc particulièrement adaptés à la détection de *Pseudomonas aeruginosa*, et de quelques autres espèces (*Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas marcescens*, *Pseudomonas mendocina* et *Ochrobactrum anthropi*), dont la fréquence de présence dans un échantillon est bien moindre que pour *Pseudomonas aeruginosa*. De ce fait la détection de la présence de cette activité enzymatique sera le plus souvent en relation avec la présence de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'échantillon biologique testé. Il est toutefois possible, comme le démontre le paragraphe qui suit, de différencier *Pseudomonas aeruginosa* d'une de ces autres espèces ayant l'activité  $\beta$ -alanine aminopeptidase.

3°) UTILISATION COMBINEE DE DEUX SUBSTRATS ENZYMATIQUES POUR REVELER DEUX ACTIVITES ENZYMATIQUES DIFFERENTES DONT L'UNE EST L'ACTIVITE ENZYMATIQUE  $\beta$ -ALANINE AMINOPEPTIDASE :

Cette utilisation de deux substrats pour révéler deux activités enzymatiques différentes est particulièrement intéressante. C'est par exemple le cas des activités  $\beta$ -glucosidase et  $\beta$ -alanine aminopeptidase.

Ainsi l'exemple A du chapitre 2 a montré que les espèces *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas mendocina* possèdent toutes les deux une activité  $\beta$ -alanine aminopeptidase. Il est toutefois possible de différencier ces deux espèces par la recherche de l'activité  $\beta$ -glucosidase qui n'est présente que chez *Pseudomonas mendocina*. Cette enzyme peut par exemple être mise en évidence avec le substrat 6-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glycopyranoside, obtenu chez Biosynth, Staad, Suisse.

La différenciation de ces deux espèces peut être réalisée en milieu gélosé, comme décrit ci-après.

A un milieu Trypticase soja gelosé sont ajoutés :

- 200 mg de 6-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glycopyranoside,
- 50 mg de  $\beta$ -Alanyl-N,N'-diméthyl-p-phénylène-diamine, et
- 15 mg d'Acide 3,5-dihydroxy-2-naphtoïque.

Le milieu est réparti et ensemencé de la façon suivante :

- 10 boîtes avec des cultures pures correspondantes à cinq souches de *Pseudomonas aeruginosa* et cinq souches de *Pseudomonas mendocina*, et
- 2 boîtes avec un mélange de deux souches l'une de *Pseudomonas aeruginosa* et l'autre de *Pseudomonas mendocina*.

5 Les boîtes de Pétri sont incubées à 35-37°C. Après 18-24 heures d'incubation, la coloration des colonies est observée. Les colonies bleues avec un halo bleu correspondent à *Pseudomonas aeruginosa* et à la présence de l'activité  $\beta$ -alanine aminopeptidase, tandis que les colonies pourpres avec un halo bleu correspondent à *Pseudomonas mendocina* et à la présence des deux activités  $\beta$ -alanine aminopeptidase  
10 et  $\beta$ -glucosidase.

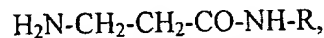
Il est ainsi très facile de différencier sur un même milieu un mélange de souches appartenant à ces deux espèces lorsqu'elles sont présentes dans un même échantillon. Cet exemple montre qu'il est possible de combiner plusieurs substrats en relation avec plusieurs réactions enzymatiques dans un même milieu réactionnel, dont une selon la  
15 présente invention pour caractériser *Pseudomonas aeruginosa*.

## REVENDICATIONS

1. Substrat enzymatique constitué d'une partie cible et d'une partie marqueur, l'hydrolyse du substrat permettant la séparation de la partie cible et de la partie  
5 marqueur, ladite partie cible caractérisant l'activité enzymatique recherchée, caractérisé par le fait que la partie cible permet de révéler une activité enzymatique  $\beta$ -alanine aminopeptidase d'au moins un micro-organisme *Pseudomonas aeruginosa*, et la partie marqueur est une molécule révélant la réaction d'hydrolyse.

10 2. Substrat, selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la partie cible est constituée de  $\beta$ -Alanine ou d'un de ses dérivés et la partie marqueur est une molécule chromogène ou fluorescente.

3. Substrat, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé par le  
15 fait qu'il est de formule :



où  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$  est la partie cible et  $-\text{NH}-\text{R}$  est la partie marqueur chromogène ou fluorescente du substrat.

20 4. Substrat, selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé par le fait que la partie marqueur est constituée de :

- $\beta$ -Naphtylamine,
- Aminométhylcoumarine, tel que 7-Amino-4-méthyl-coumarine,
- dérivé de l'Aminobenzène, tel que 4-Amino-2,6-dichlorophénol,
- 25 - p-Nitroaniline, ou
- 2-Amino-indoxyl ou 3-Amino-indoxyl.

5. Composition permettant la détection d'au moins une souche et/ou une espèce de micro-organismes qui comprend au moins un substrat, selon l'une quelconque des  
30 revendications 1 à 4, et un milieu de culture.

6. Composition permettant la détection d'au moins souche et une espèce de micro-organismes ou d'au moins deux souches ou deux espèces de micro-organismes, qui comprend au moins un substrat, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, au moins un autre substrat et un milieu de culture.

5

7. Composition, selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6, caractérisée par le fait que le milieu de culture contient un révélateur.

8. Composition, selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisée par le fait que le milieu de culture contient :

10

- du sel de diazonium, lorsque la partie marqueur libérée est la  $\beta$ -Naphtylamine, ou
- de l'Acide 3,5-dihydroxy-2-naphtoïque, lorsque la partie marqueur libérée est un dérivé de l'Aminobenzène, tel que le Dichloro-amino-phénol.

15

9. Composition, selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, caractérisée par le fait qu'elle est sous la forme d'un milieu liquide ou d'un milieu gélosé.

10. Procédé de détection de l'espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa*, consistant :

20

- à mettre au moins un substrat permettant de détecter l'activité enzymatique  $\beta$ -alanine aminopeptidase en présence d'un échantillon suspecté de contenir au moins un micro-organisme *Pseudomonas aeruginosa*, et
- à observer l'apparition de réactions colorées et/ou fluorescentes.

25

11. Procédé de détection de l'espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa*, consistant :

30

- à mettre au moins un substrat permettant de détecter l'activité enzymatique  $\beta$ -alanine aminopeptidase en présence d'un échantillon suspecté de contenir au moins un micro-organisme *Pseudomonas aeruginosa*,
- à mettre au moins un substrat permettant de détecter une activité enzymatique différente de  $\beta$ -alanine aminopeptidase en présence de l'échantillon suspecté de

contenir au moins un autre micro-organisme que *Pseudomonas aeruginosa*, cette autre activité enzymatique permettant de différencier *Pseudomonas aeruginosa* de cet autre micro-organisme, et

- à observer l'apparition de réactions colorées et/ou fluorescentes.

5

12. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 10 ou 11, caractérisé en ce que le milieu de culture est gélifié.

10 13. Procédé, selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'on ajoute dans le milieu de culture un produit réduisant la migration de la ou des colorations et/ou fluorescences obtenues.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
14 juin 2001 (14.06.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 01/42491 A3

- (51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12Q 1/04, 1/37, C07C 237/20
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR00/03398
- (22) Date de dépôt international : 6 décembre 2000 (06.12.2000)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité : 99/15312 6 décembre 1999 (06.12.1999) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : BIOMERIEUX S.A. [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy l'Etoile (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (73) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : DESMON-CEAUX, Mireille [FR/FR]; 101, rue du Crapier, F-01150 Lagnieu (FR). MONGET, Daniel [FR/FR]; Résidence du Moulin, 13, rue du Moulin-du-Buis, F-01150 Saint-Sorlin-en-Bugey (FR).
- (74) Mandataire : BONNEAU, Gérard; Cabinet Bonneau, Les Taissounières HB3, 1681, route des Dolines, F-06560 Sophia Antipolis (FR).
- (81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :  
— avec rapport de recherche internationale
- (88) Date de publication du rapport de recherche international: 11 avril 2002
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: NOVEL ENZYMATIC SUBSTRATES FOR DETECTING PSEUDOMONAS AERUGINOSA

(54) Titre : NOUVEAUX SUBSTRATS ENZYMATIQUES POUR LA DETECTION DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

(57) Abstract: The invention concerns an enzymatic substrate consisting of a target portion and a marker portion, the target portion being separated from the marker portion by hydrolysing the substrate, said target portion characterising the desired enzymatic activity. The invention also concerns a composition containing at least such a substrate and a method for detecting the *Pseudomonas aeruginosa* bacterial species. The target portion of the substrate enables to reveal a  $\beta$ -alanine aminopeptidase enzymatic activity and the marker portion is a molecule revealing the hydrolysis reaction. The invention is particularly useful in the field of diagnosis.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un substrat enzymatique constitué d'une partie cible et d'une partie marqueur, l'hydrolyse du substrat permettant la séparation de la partie cible et de la partie marqueur, ladite partie cible caractérisant l'activité enzymatique recherchée. Elle concerne également une composition contenant au moins un tel substrat, ainsi qu'un procédé de détection de l'espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa*. La partie cible du substrat permet de révéler une activité enzymatique  $\beta$ -alanine aminopeptidase et la partie marqueur est une molécule révélant la réaction d'hydrolyse. L'invention trouve une application préférentielle dans le domaine du diagnostic.

WO 01/42491 A3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/03398

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 7 C12Q1/04 C12Q1/37 C07C237/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q C07C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KASAFIREK, EVZEN ET AL: "Role of amino acid residues in chromogenic substrates cleaved by pancreatic elastase" COLLECT. CZECH. CHEM. COMMUN. (1987), 52(6), 1625-33. XP002147482 cited in the application page 1631 --- -/--	1-4



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 September 2001

Date of mailing of the international search report

26/09/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P. B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hart-Davis, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/03398

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J B SUSZKIW, A S BRECHER: "Brain Aminoacyl Arylamidase. Further Purification of the Soluble Bovine Enzyme and Studies on Substrate Specificity and Possible Active-Site Residues" BIOCHEMISTRY, vol. 9, no. 20, 1970, pages 4008-4017, XP002147483 cited in the application page 4010, line 11, paragraph 2 - line 29 ---	1-4
A	WO 99 51767 A (BIO MERIEUX ;MONGET DANIEL (FR); ORENGA SYLVAIN (FR); ARMSTRONG LY) 14 October 1999 (1999-10-14) cited in the application claims 1-3,7-10,16 ---	1-9
A	VERMELHO ALANE BEATRIZ; MEIRELLES MARIA NAZARETH LEAL; LOPES ANDREA; ET AL.: "Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates" MEMORIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ, vol. 91, 1996, pages 755-760, XP000937984 the whole document ---	1,5, 10-13
A	LOUIS DOMINIQUE; KOHLMANN MARKUS; WALLACH JEAN: "Spectrophotometric assay for amidolytic activity of alkaline protease from Pseudomonas aeruginosa" ANALYTICA CHIMICA ACTA, vol. 345, 1997, pages 219-225, XP000937983 the whole document ---	1,5, 10-13
A	BESSON CHRISTINE; SAULNIER JOELLE; WALLACH EJEAN M: "Synthetic peptide substrates for a conductimetric assay of Pseudomonas aeruginosa elastase" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 237, 1996, pages 216-223, XP002147484 the whole document ---	1,5, 10-13
A	SAULNIER J M; WALLACH J M: "CONDUCTIMETRIC ASSAY OF ELASTASE IN THE SUPERNATANTS OF CULTURES OF PSEUDOMONAS-AERUGINOSA STRAINS" ANALYTICA CHIMICA ACTA, vol. 247, 1991, pages 79-82, XP000938055 the whole document -----	1,5, 10-13

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/03398

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9951767	A	14-10-1999	FR 2777018 A1	08-10-1999
			AU 3040699 A	25-10-1999
			BR 9909356 A	12-12-2000
			EP 1066405 A1	10-01-2001
			WO 9951767 A1	14-10-1999
<hr/>				

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

ande internationale No  
PCT/FR 00/03398

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 7    C12Q1/04    C12Q1/37    C07C237/20		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou a la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7    C12Q    C07C		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	KASAFIREK, EVZEN ET AL: "Role of amino acid residues in chromogenic substrates cleaved by pancreatic elastase" COLLECT. CZECH. CHEM. COMMUN. (1987), 52(6), 1625-33, XP002147482 cité dans la demande page 1631 <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">           ---            -/--         </div>	1-4
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</span> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">17 septembre 2001</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">26/09/2001</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Hart-Davis, J</div>

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

C ande Internationale No  
PCT/FR 00/03398

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	J B SUSZKIW, A S BRECHER: "Brain Aminoacyl Arylamidase. Further Purification of the Soluble Bovine Enzyme and Studies on Substrate Specificity and Possible Active-Site Residues" BIOCHEMISTRY, vol. 9, no. 20, 1970, pages 4008-4017, XP002147483 cité dans la demande page 4010, ligne 11, alinéa 2 - ligne 29 ---	1-4
A	WO 99 51767 A (BIO MERIEUX ; MONGET DANIEL (FR); ORENGA SYLVAIN (FR); ARMSTRONG LY) 14 octobre 1999 (1999-10-14) cité dans la demande revendications 1-3, 7-10, 16 ---	1-9
A	VERMELHO ALANE BEATRIZ; MEIRELLES MARIA NAZARETH LEAL; LOPES ANDREA; ET AL.: "Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates" MEMORIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ, vol. 91, 1996, pages 755-760, XP000937984 le document en entier ---	1,5, 10-13
A	LOUIS DOMINIQUE; KOHLMANN MARKUS; WALLACH JEAN: "Spectrophotometric assay for amidolytic activity of alkaline protease from Pseudomonas aeruginosa" ANALYTICA CHIMICA ACTA, vol. 345, 1997, pages 219-225, XP000937983 le document en entier ---	1,5, 10-13
A	BESSON CHRISTINE; SAULNIER JOELLE; WALLACH JEAN M: "Synthetic peptide substrates for a conductimetric assay of Pseudomonas aeruginosa elastase" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 237, 1996, pages 216-223, XP002147484 le document en entier ---	1,5, 10-13
A	SAULNIER J M; WALLACH J M: "CONDUCTIMETRIC ASSAY OF ELASTASE IN THE SUPERNATANTS OF CULTURES OF PSEUDOMONAS-AERUGINOSA STRAINS" ANALYTICA CHIMICA ACTA, vol. 247, 1991, pages 79-82, XP000938055 le document en entier -----	1,5, 10-13

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Requête internationale No

PCT/FR 00/03398

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9951767 A	14-10-1999	FR 2777018 A1	08-10-1999
		AU 3040699 A	25-10-1999
		BR 9909356 A	12-12-2000
		EP 1066405 A1	10-01-2001
		WO 9951767 A1	14-10-1999
-----			